

## 明細書

## 蛋白質結晶化装置、蛋白質結晶化方法、蛋白質結晶化剤、及びその調製方法

## 技術分野

本発明は、蛋白質の結晶化あるいは結晶化条件のスクリーニングを行うための装置および方法、並びに蛋白質含有試料から蛋白質の結晶を析出させるための蛋白質結晶化剤及びその調製方法に関する。

## 背景技術

近年、蛋白質の立体構造と蛋白質の機能との関係を明らかにすることにより、それをコードする遺伝子の機能を解明しようとする、構造ゲノム科学と呼ばれる研究が行われている。

蛋白質の立体構造の解析は、通常、解析しようとする蛋白質の結晶化条件をまずスクリーニングする。その後、最適な結晶化条件における結晶化を実施する。そして得られた結晶をX線構造解析に供することにより、蛋白質の立体構造の解析が行われている。ここで、蛋白質の結晶化条件をスクリーニングする過程においては、立体構造解析を行うのに十分に良好な結晶を得る条件を決定するまでに、多くの時間と多量の蛋白質試料を費やしている。そのため、これが立体構造解析におけるボトルネックとなっている。また、蒸気拡散法を始めとしてとする様々な結晶化方法が考案されている。しかし、実験操作が煩雑である等依然として課題は多い。これら既存の方法に代わる新しい結晶化方法や装置の開発が行われ、蛋白質の結晶化条件のスクリーニング、あるいは結晶化を迅速に、より微量のサンプルで行うための、種々の蛋白質結晶化装置や結晶化方法、結晶化スクリーニング方法が提案されている。例えば特開平6-321700号公報では、沈殿剤や蛋白質をゲル中に含有させ、これらを積層することにより、溶液中で見られる対流を抑えてゲル中で結晶を成長させる方法が提案されている。また、これ以外にも、結

晶化方法を簡略化するため、ゲル状物を利用しようとする試みがなされている。さらには、結晶化条件の探索に際して、様々な沈殿化剤が提案されている。

しかし、ゲル状物を利用する場合、ゲル状物と沈殿剤の組み合わせによっては、ゲルが白濁したり、ゲル化反応が進行しなかったりという問題があった。ゲルが白濁すれば、結晶化状態の有無を顕微鏡により観察することができず問題となる。

また、本発明者らの一部は、蛋白質の結晶化条件のスクリーニングを迅速に、かつ微量のサンプルで経済的に行うことの目的として、結晶化実験を、マイクロアレイ型のチップ上で行うような結晶化装置を提案している（例えば、WO 03/053998号パンフレット）。

WO 03/053998号パンフレットに記載の発明では、マイクロアレイを使用している。そのマイクロアレイは、貫通孔により形成された各区画内にゲル状物が保持されている。そして各ゲル状物には、複数の種類および濃度の蛋白質結晶化剤が含まれている。このマイクロアレイを蛋白質含有試料と接触させることにより、一度に複数の結晶化条件をスクリーニングすることができる。さらに、微量の蛋白質試料で実施することができ、非常に効率的である。

しかしながら、上記の蛋白質結晶化装置では、マイクロアレイの区画間で、蛋白質含有試料及び／又は結晶化剤の移動、混合（汚染）が起こる。そのため、結晶が析出した条件が予め区画内のゲル状物に含まれる結晶化剤の濃度や種類と一致しない虞があった。

また、このような装置では、蛋白質含有試料を手作業で結晶化剤保持部分に供する必要があり、操作が煩雑となる。また、自動的に蛋白質含有試料を供する自動装置は高価である。

本発明は前記課題を解決するためになされたものである。本発明は、ゲルの白濁化を起こさずに、ゲル化反応を進行させる、蛋白質結晶化剤とその調製方法、並びに蛋白質の結晶化実験あるいは結晶化条件のスクリーニングを、迅速かつ経済的に、高い信頼性をもって実施することができる蛋白質結晶化装置を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明は、以下のものを提供する。

- ・蛋白質結晶化剤を保持した2以上の結晶化剤保持部を有する蛋白質結晶化用マイクロアレイと、前記蛋白質結晶化用マイクロアレイと積層されるプレートとを有し、前記プレートは、前記結晶化剤保持部に対応し蛋白質含有試料を充填可能な結晶化区画と、該結晶化区画の間に設けられた凹部とを有することを特徴とする蛋白質結晶化装置；
- ・アクリルアミド、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩の群から選択される少なくとも1種のモノマーを含むゲル状物に塩化ナトリウムが保持されている蛋白質結晶化用ゲル；
- ・ジメチルアクリルアミドを含むゲル状物にMPDが保持されている蛋白質結晶化用ゲル；
- ・2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸を含むゲル状物にリン酸Na/Kが保持されている蛋白質結晶化剤；
- ・メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩を含むゲル状物に、硫酸アンモニウムが保持されている蛋白質結晶化用ゲル；
- ・アクリルアミドを含むゲル状物に、マロン酸ナトリウムが保持されている蛋白質結晶化用ゲル；
- ・ポリオキシエチレンモノアクリレートを含むゲル状物にPEG6kが保持されている蛋白質結晶化用ゲル。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の蛋白質結晶化装置の使用状態を示す模式図である。

図2は、本発明に用いられる蛋白質結晶化用マイクロアレイの例を示す。

図3は、本発明の蛋白質結晶化装置の一例を示す模式図である。

図4は、本発明に用いられるプレートの一部の断面図である。

図5は、本発明に用いられるプレートの平面図である。

図6は、本発明におけるプレートおよびサンプル充填補助具の使用状態を示す

平面図である。

図7は、本発明に用いられる支持体の平面図である。

図8は、本発明の蛋白質結晶化装置の使用状態を示す平面図である。

#### 符号の説明

12 中空繊維； 16 結晶化剤保持部； 18 蛋白質結晶化用マイクロアレイ； 20 支持体； 24 プレート； 32 結晶化区画； 34 凹部

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について、図面を参照して説明する。

図1は、本発明の蛋白質結晶化装置の一例を示す模式図である。

この例の蛋白質結晶化装置は、図1に示すように、支持体20、シリコンゴム製のパッキング22、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18、プレート24を備えている。

パッキング22は蛋白質結晶化用マイクロアレイ18と同じ形状および面積の中空部23を有している。支持体20には、該パッキング22の外周と同じ形状および大きさのマイクロアレイ支持部26が設けられている。マイクロアレイ支持部26には、パッキング22と同一の形状のマーキング28が施されている。

パッキング22は、マーキング28に位置を合わせてマイクロアレイ支持部26上に設置されている。そして蛋白質結晶化用マイクロアレイ18が、マイクロアレイ支持部26上に、パッキング22の中空部23に格納されて設置されている。ここで、プレート24に設けられた結晶化区画32と、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18上の結晶化剤保持部16とを正確に接触させるために、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18の上面と、支持体20の上面とは、同じ高さになっていることが好ましい。

図3は、プレート24の中央部を拡大した断面図である。図4に、支持体20、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18、プレート24が組み立てられた状態の一部

の断面図を示す。

プレート24は、図3、4に示すように、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18の結晶化剤保持部16の各々と対応した配列の結晶化区画32と、該結晶化区画32の間に設けられた凹部34とを有する。なお、各々の結晶化区画32は、プレート24において凹部34に対し凸な部位である結晶化区画支持部31の先端にそれぞれ支持されている。

このプレート24は、支持体20に支持された蛋白質結晶化用マイクロアレイ18の上に積層される。すなわち、図4に示すように、結晶化区画32は、結晶化剤保持部16によって密封されている。更に、結晶化区画支持部31に支持された結晶化区画32と、同様に結晶化区画支持部31に支持された結晶化区画32との間に、各々凹部34が位置する。

以下、支持体20のうち蛋白質結晶化用マイクロアレイ18を支持する面をマイクロアレイ支持面100、プレート24のうち蛋白質結晶化用マイクロアレイ18に接する面を反応面102、それと反対側の面を外側面104と称する。

なお、プレート24において、結晶化区画32の配列された領域の外縁は凹部となる。従って、プレート24において凹状となった一定面積の領域が形成される。以下、プレート24の反応面のうち、結晶化区画32が配列された凹状の領域を、シール部30と称する。

この例においては、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18が、支持体20のマイクロアレイ支持部26上に設置されている。しかし、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18は、結晶化剤保持部16が結晶化区画32に対応して該結晶化区画32を密封できるように設置されていればよい。即ち蛋白質結晶化用マイクロアレイ18は、支持体20に接着されていてもよいし、マイクロアレイ支持部26を凹状に形成し、該マイクロアレイ支持部の底部に接着せずに積層されていてもよい。

支持体20の材料および形状は、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18を固定可能なものであれば、特に限定されない。支持体20の材料としては、光透過性の材料を用いることにより、生成した結晶を結晶化装置のまま迅速・簡便に顕微鏡にて確認でき、結晶の成長過程を経時的に観察できることから好ましい。光透過性の材料としては、例えばアクリル樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリスチレン

樹脂、ポリジメチルシロキサン (PDMS)、ガラス等が挙げられる。

支持体 20 には、蛋白質結晶化用マイクロアレイ 18 の固定位置を決めるためのマーキングが施されている。マーキング方法は、蛋白質結晶化用マイクロアレイ 18 を正確な固定を可能とするものであれば特に限定されない。例えば、蛋白質結晶化用マイクロアレイ 18 と同様の形状および面積を有する窪み、蛋白質結晶化用マイクロアレイ 18 の所定の位置に対応する支持体 20 上の位置に塗装された点などが挙げられる。

この例では、図 7 に示すように、支持体 20 に、プレート 24 と支持体 20 とを積層する際に結晶化区画 32 と結晶化剤保持部 16 とを対応させるプレート位置決め孔 44 がさらに設けられている。

蛋白質結晶化用マイクロアレイ 18 は、蛋白質結晶化剤を保持した 2 以上の結晶化剤保持部 16 を有する。

結晶化剤保持部 16 としては、ゲル等の蛋白質結晶化剤を保持できる多孔質体 (以下、保持相とする) に蛋白質結晶化剤を保持させたものを用いることができる。保持相は、図 4 に示すように結晶化区画 32 に充填された蛋白質含有試料が結晶化剤保持部 16 に接触した際に、該保持相から結晶化区画 32 へ蛋白質結晶化剤が移動するものであればよい。

前記保持相としては、ゲルを用いることが好ましい。ゲルを用いることにより、結晶化剤保持部 16 から、結晶化区画 32 に充填された蛋白質含有試料への蛋白質結晶化剤の移動が、適度に緩やかな速度に制御される。そのため、安定した結晶化を実現できる。

ゲルの材料は特に制限されないが、例えば、アクリルアミド、N, N-ジメチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-アクリロイルアミノエトキシエタノール、N-アクリロイルアミノプロパノール、N-メチロールアクリルアミド、N-ビニルピロリドン、ヒドロキシエチルメタクリレート、(メタ)アクリル酸、アリルデキストリン等の単量体の一種類または 2 種類以上と、メチレンビス (メタ) アクリルアミド、ポリエチレングリコールジ (メタ) アクリレート等との多官能性単量体を、例えば水性媒体中で共重合したゲルを用いることができる。その他に、ゲルとして、例えばアガロース、アルギン酸、デキストラ

ン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等のゲル、またはこれらを架橋したゲルを用いることができる。

蛋白質結晶化用マイクロアレイ 18 に、上記のようなゲルを保持させるには、例えば、ゲルの構成成分であるアクリルアミド等の単量体、多官能性単量体および開始剤を含む液を該容器に注入し、重合させてゲル化させればよい。ゲル化させる方法としては、多官能性単量体の存在下に共重合させる方法の他、多官能性単量体の非存在下に共重合させたのち架橋剤を用いる方法であってもよい。また、ゲル材料としてアガロースを用いる場合は、温度降下によってゲル化を行ってよい。

蛋白質結晶化剤をゲルに保持させる場合、その方法は、特に制限されるものではない。例えば、予め蛋白質結晶化剤と上記の重合性モノマーとを混合して、適当な容器に導入しておき、その後、重合反応を行ってゲルを形成させる。これにより、蛋白質結晶化剤をゲルに保持させることができる。ここで、蛋白質結晶化剤を多孔性粒子等を含浸させ、その粒子をゲルに包括させることもできる。

蛋白質結晶化用マイクロアレイ 18 の材料、形状等は、反応用物質が多数個整列配置されており、結晶析出の観察を妨げないものであれば、特に限定されない。

蛋白質結晶化用マイクロアレイ 18 の材料としては、例えば、ガラス、樹脂、金属等が挙げられる。また、これらの材料を組み合わせて作製した複合体を用いてもよい。ただし、蛋白質結晶の析出の有無を容易に確認するために、光透過性の高い材料を用いることが好ましい。

蛋白質結晶化用マイクロアレイ 18 の形状としては、例えば、円形、正方形、長方形などの形状が挙げられる。また、その厚みについては、結晶化の効率の向上や、結晶析出の観察の容易化および迅速化を考慮して任意に選択できる。例えば 0. 1 ~ 5 mm、好ましくは 0. 2 ~ 2 mm とすることができる。

図 2 に、本発明の蛋白質結晶化装置に用いられる蛋白質結晶化用マイクロアレイの好適な例として、複数の中空管状体を配列してなるマイクロアレイを示す。図 2 に示すように、基板 10 に、中空管状体として 2 本以上の中空纖維 12 が区画配列されて固定されている。これらの中空纖維 12 は中空部 14 を有している。これらの中空部 14 に、蛋白質結晶化剤を保持したゲルが充填されて、結晶化剤

保持部16を成している。すなわち、基板10に、2つ以上の結晶化剤保持部16が区画配列されて、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18を構成している。

中空纖維12は、例えば、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート等のメタクリレート系モノマー、メチルアクリレート、エチルアクリレート等のアクリレート系モノマーの単独重合体もしくはこれらの共重合体、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ノボルネン/エチレン共重合体、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ガラス等から形成されるものが挙げられる。

中空纖維12の内壁表面は、無処理の状態で用いてもよい。また必要に応じて、プラズマ処理や $\gamma$ 線、電子線などの放射線処理を施したものであってもよい。さらに、中空纖維12は、必要に応じて反応性官能基を導入したものであってもよい。

中空纖維12の外径は、単位面積あたりの結晶化剤保持部16の数を多くするために、2mm以下であることが好ましい。0.7mm以下であることがより好ましい。また、中空纖維12の内径は、前記外径の範囲内で適宜選択される。

基板10に、2つ以上の中空纖維12を区画配列して固定する方法としては、以下の方法を用いることができる。すなわち、まず、中空纖維12を、所定の間隔をもって平行に配列させる。これらの中空纖維12を収束した後に接着して、纖維配列体（三次元配列体）となすことができる。得られた三次元配列体を、ミクロトームなどの切片作成用の装置を用いて、纖維軸と交差する方向、好ましくは纖維軸に対して垂直方向に切断する。これにより、中空纖維配列体断面を有する薄片（図2）からなるマイクロアレイを得ることができる。薄片の厚みは、通常100～5000 $\mu\text{m}$ として用いることができる。好ましくは200～2000 $\mu\text{m}$ である。

このとき、中空纖維12を規則的に配列し、樹脂接着剤等で接着することにより、例えば、縦横に中空纖維12が整然と規則的に配列した中空纖維配列体を得ることができる。中空纖維配列体の形状は特に限定されるものではない。通常は、纖維を規則的に配列させることにより、正方形、長方形、円形等に形成される。

「規則的に」とは、一定の大きさの枠の中に含まれる纖維の本数が一定となる

ように順序良く配列させることをいう。例えば、直径1 mmの纖維を束にして断面が縦10 mm、横10 mmの正方形となるように配列させようとする場合は、その正方形の枠内( $1 \text{ cm}^2$ )における1辺に含まれる纖維の数を10本とする。そしてこの10本の纖維を1列に束ねて1層のシートとする。その後、このシートが10層になるように重ねる。その結果、縦に10本、横に10本、合計100本の纖維を配列させることができる。ただし、纖維を規則的に配列させる手法は、上記のようにシートを重層するものに限定されるものではない。

蛋白質結晶化用マイクロアレイ18として、上記のような、複数の中空管状体を配列してなるマイクロアレイを用いることによって、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18の厚み、結晶化剤保持部16の体積、保持される蛋白質結晶化剤の種類および濃度等を、良好に制御して、かつ効率よく、蛋白質結晶化装置を製造することができる。

なお、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18は、外気との接触を防ぐ密閉性のよい容器やシール等で密閉することにより保存されることが好ましい。密閉性のよい容器としては、例えば、気体や水の透過率の小さい高分子材料や、ガラス、金属等が挙げられる。また、このようなマイクロアレイは、低温で保存されが好ましく、特に長期にわたる保存の場合は凍結保存してもよい。

さらに、各々の結晶化剤保持部16が、異なる蛋白質結晶化条件に調製されたゲルからなることが好ましい。このことにより、結晶化条件のスクリーニングを行う場合に、スクリーニングを一枚のマイクロアレイ上で迅速に行うことができる。

ここで、蛋白質結晶化条件とは、蛋白質結晶化剤の種類および濃度、蛋白質結晶化剤を保持させる保持相、例えば蛋白質結晶化剤を保持させて固化させた後のゲルのpH、ゲルの組成、架橋度、結晶化剤保持部16および結晶化区画32の温度、時間、冷却プロファイル等である。

蛋白質結晶化剤の種類としては、例えば、沈殿剤、pH緩衝剤、これらの任意の組み合わせ等が挙げられる。

沈殿剤としては、例えば、塩化ナトリウム、ポリエチレングリコール、2-メチル-2, 4-ペンタンジオール、硫酸アンモニウム等が挙げられる。pH緩衝

剤としては、例えば、酢酸ナトリウム三水和物、リン酸カリウム、イミダゾール、クエン酸ナトリウム、カコジル酸ナトリウム等が挙げられる。これらを単独で使用してもよいし、任意の組み合わせの2種以上で使用してもよい。さらに、蛋白質結晶化剤としては、市販品として、Emerald BioStructure s社製「WIZARD II」、Hampton Research社製「Crys tal screen」、「Grid Screen」等を用いることができる。

蛋白質結晶化剤の濃度としては、用いる蛋白質結晶化剤の種類にもよるが、例えば、ポリエチレングリコールからなる沈殿剤の場合は、5～50体積%、好ましくは10～35体積%である。一方、pH緩衝剤の場合には、0.05～0.5mol/L、好ましくは0.1～0.2mol/Lである。

上述のように、各々の結晶化剤保持部16を、それぞれ異なる蛋白質結晶化条件に調製することにより、対象の蛋白質についての結晶化条件のスクリーニングを迅速に行うことができる。ここで、例えば、蛋白質結晶化剤の濃度を多段階に設定することが好ましい。具体的には、塩化ナトリウムからなる沈殿剤を用いる場合は、0.5～4.0mol/Lの範囲で、5段階、10段階、20段階のように希釈列を作製する。そして、それぞれの濃度の蛋白質結晶化剤を、結晶化剤保持部16に充填することができる。

蛋白質結晶化用マイクロアレイ18は、10～1000個の結晶化剤保持部16を有することが、より多数の結晶化条件における結晶化を一括して行うために好ましい。例えば、通常の蛋白質結晶化条件スクリーニングにおいては、800程度の結晶化条件を検討することが必要である。従って、結晶化剤保持部の数が10以上であることが好ましい。一方、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18が1000を超える結晶化剤保持部16を有すると、結晶化剤保持部16間の間隔が非常に狭くなり、取り扱いの効率に劣る。

蛋白質結晶化用マイクロアレイ18は、蛋白質析出の確認を容易に行うために、光透過性の高い材料からなることが好ましい。

この例において、パッキング22はシリコンゴム製である。パッキングの材料は、蛋白質結晶化装置におけるその他の構成要素（例えば、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18、プレート24、支持体20）と組み合わせて用いるのに適当な

ものであれば特に限定されない。

プレート24は、結晶化剤保持部16に対応し蛋白質含有試料を充填可能な結晶化区画32と、これらの結晶化区画32の間に設けられた凹部34とを有する。すなわち、結晶化剤保持部16と同数の結晶化区画32が、プレート24上に設けられている。

プレート24には、後述のサンプル充填補助具との位置を合わせる位置決め部として、例えば、サンプル充填補助具位置決め孔50が形成されていることが好ましい。

この例では、支持体20上に、プレート24と支持体20とを積層する際に結晶化区画32と結晶化剤保持部16とを対応させるプレート位置決め部材44がさらに設けられている。プレート24上に、支持体20上に設けられたプレート位置決め部材44と対応するプレート位置決め孔46が形成されている。

この例では、図1、5に示すように、さらに、プレート24の外側面104から反応面102へ貫通するシール剤注入口48が穿たれている。図5に示すように、この例では、2つのシール剤注入口48がシール部30を介して互いに反対側に穿たれている。このことにより、一方のシール剤注入口48からシール部30にシール剤を注入した場合に、初めにシール部30内に存在した空気が他方のシール剤注入口48から排出されるため、シール部30において凹部34の間に位置する結晶化区画32がより確実に密封される。

プレート24の材料および形状は、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18と重ね合わせができるものであれば特に限定されず、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18の形状を考慮して任意のものを用いることができる。プレートの材料としては、ガラス、樹脂、金属などを例示することができる。これらの中から任意のものを選択し、単独で、または2種類以上を組み合わせて用いることもできる。なお、結晶化区画32における蛋白質の結晶化状態を観察するために、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18と重ねた際に各結晶化剤保持部16と対応して重なる部分が光透過性をもつことが好ましい。そのため、プレート24の材料としては、光透過性の材料、例えば透明な樹脂、ガラス等を用いることが好ましい。

プレート24は、結晶化区画32に析出した結晶を回収する結晶回収機構をさ

らに有することが好ましい。このような結晶回収機構を用いて、結晶化区画32に析出した結晶を回収して種結晶として用いる。そして引き続いて結晶成長過程を行うことによってX線構造解析に耐える結晶を迅速に得ることができる。もちろん、析出した結晶がそのままX線構造解析に耐える結晶であれば、それを回収して解析に使用する。

このような結晶回収機構としては、例えば、シール部30がプレート24と独立した部材からなり、プレート24とヒンジ機構で接続され、所望に応じシール部30を外側面104側へ開くことができる機構等が挙げられる。

結晶化区画32の形状は、蛋白質含有試料を充填可能であり、結晶化剤保持部16と接触した際に密閉されるものであれば、特に限定されない。

結晶化区画32の容量は、対象の蛋白質について結晶化条件のスクリーニングを行うことを目的とする場合には、結晶化条件のスクリーニングに要する蛋白質量を低減するために、0.5μl未満であることが好ましい。一方、ここで析出した結晶を引き続いてX線構造解析に供する、または構造解析に供する結晶を作製するための種結晶として用いることを目的とする場合には、結晶化区画32の容量は0.5μl以上であることが好ましい。この場合、X線構造解析を行うことのできる0.1mm以上の大きな結晶が得られるためである。結晶化剤保持部16と結晶化区画32との面積の関係は、結晶化剤保持部16と結晶化区画32とが接触する面の面積が、結晶化剤保持部16に保持された結晶化剤が結晶化区画32に移動して、該結晶化区画32に充填された蛋白質含有試料と反応することができる条件であればよい。結晶化剤保持部16よりも結晶化区画32の方が大きくてもよい。ただし、結晶化区画32は、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18を構成する基板12に接触しないことが好ましい。

この例では、さらに、図4に示すように、結晶化区画32の間に設けられた凹部34の全てにシール剤35が充填される。

シール剤35としては、蛋白質含有試料と互いに溶解せず、プレート24、パッキング22、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18を構成する基板12等の部材を侵食しないものであればよい。例えば、パラフィンオイル、シリコンオイル等を用いることができる。

シール剤35を用いなくても、凹部34を有することにより、隣接する区画への蛋白質含有試料の侵入を防止することができる。しかしシール剤35を用いると、さらに確実に蛋白質含有試料どうしの混合および近接する結晶化区画32への侵入を防止することができるとともに、蛋白質含有試料の蒸発を防止することができる。

この例では、さらに、支持体20に支持された蛋白質結晶化用マイクロアレイ18とプレート24とを圧接する機構が示されている。具体的には図1に示すように、支持体20を貫通する第一のネジ孔40と、第一のネジ孔40に対応してプレート24を貫通する第二のネジ孔42とが設けられている。これらの第一のネジ孔40、第二のネジ孔42に、図1に示すようにネジ41が螺挿される。このような機構を用いることにより、結晶化区画32を、より安定して密閉状態に保持することができる。

この例の蛋白質結晶化装置において、結晶化区画32における蛋白質の結晶化をモニタリングする検出機構をさらに設けることができる。

前記検出機構としては、例えば、プレート24の外側面104に設置された顕微鏡と、顕微鏡に搭載されたCCDカメラからなる検出機構が挙げられる。このような検出機構において、顕微鏡に搭載したCCDカメラにより結晶の析出の様子を撮影記録し、記録された画像データを処理することによって、結晶化の成否を迅速に判断することができる。したがって、迅速に蛋白質結晶化条件を決定することができる。

ここで、この例の蛋白質結晶化装置の好適な使用方法を例示する。

#### [蛋白質含有試料の充填]

この例では、サンプル充填補助具を用いて、結晶化区画32に蛋白質含有試料を充填することができる。

#### (結晶化区画)

本発明を使用する際に、蛋白質の結晶化を目的とする場合は、結晶化区画32の容量を0.5μl以上とすることが好ましい。蛋白質結晶化条件のより迅速なスクリーニングを目的とする場合は、結晶化区画32の容量を0.5μl未満とすることが好ましい。

## (蛋白質含有試料)

本発明において、蛋白質含有試料とは、結晶化を行おうとする、または結晶化条件を特定しようとする蛋白質（以下、対象の蛋白質と称する）を含む試料である。蛋白質としては、天然又は合成のペプチド、ポリペプチド、蛋白質および蛋白質複合体が挙げられる。これらの物質は、天然もしくは合成材料から抽出・単離、または遺伝子工学的手法もしくは化学合成手法等により生成した後、通常の精製法、例えば溶媒抽出、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーなどを組み合わせて用いることにより、対象の蛋白質を精製しておくことが好ましい。

蛋白質含有試料中の蛋白質濃度および純度も蛋白質結晶化条件の一要因となる。そのため、数段階の濃度および純度の蛋白質含有試料を調製して蛋白質結晶化剤と反応させてもよい。例えば、蛋白質濃度は、1～50 mg/ml の範囲内で数段階に変更することが好ましい。また、蛋白質結晶化剤と反応させる蛋白質含有試料の量は、用いる結晶化区画32の容量および数等に応じて適宜変更しうる。なお、蛋白質含有試料の粘度は、該蛋白質含有試料を保持した結晶化区画32を下に向けてプレート24を保持した際に結晶化区画32から蛋白質含有試料が漏出しなければ特に限定されない。

蛋白質含有試料は、対象の蛋白質のほか、さらに、蛋白質の溶解を助ける蛋白質可溶化剤、還元剤等の安定化剤等を含有してもよい。蛋白質可溶化剤としては、例えば膜蛋白質を溶解させる界面活性剤などが挙げられる。界面活性剤を用いると、蛋白質含有試料において、例えば膜蛋白質などの水溶解性の低い蛋白質を良好に分散させることができる。従って、この例の蛋白質結晶化装置を適用して効率よく蛋白質の結晶化を行うことができる。

まず、図1に示すようなプレート24を、図5に示すように反応面102を上にして静置する。プレート24に穿たれたサンプル充填補助具位置決め孔50およびプレート位置決め孔46に、このサンプル充填補助具位置決め孔50およびプレート位置決め孔46と同一径の円柱形のガイドピン52を1本ずつ挿入して固定する。

ついで、この反応面102の上に、図6に示すような、プレート24上の結晶

化区画32に対応した配列の穿孔56と、該穿孔56をプレート24上で結晶化区画32に対応させる位置合わせ機構として2つの位置合わせ孔58とを有する薄板状のサンプル充填補助具54を設置する。このとき、プレート24のサンプル充填補助具位置決め孔50およびプレート位置決め孔46にそれぞれ固定されたガイドピン52に、サンプル充填補助具54に穿たれた位置合わせ孔58を合わせて差し込む。そして、サンプル充填補助具54をプレート24上に設置する。このことにより、プレート24の結晶化区画32とサンプル充填補助具54の穿孔56が対応するようにサンプル充填補助具54が設置される。

その後、プレート24上に設置されたサンプル充填補助具54の上に、サンプル充填補助具54のうち穿孔56の配置された領域全体に行き渡る分量の蛋白質含有試料を載せる。

さらに、スパチュラ等を用いてサンプル充填補助具54の表面を擦ることにより、穿孔56に対応した結晶化区画32に蛋白質含有試料を充填する。

その後、ガイドピン52をプレート24の反応面102側から外側面104側へ押し出し、サンプル充填補助具54をプレート24上から取り除く。このことにより、全ての結晶化区画32に蛋白質含有試料が充填される。

上記説明したように、サンプル充填補助具54をプレート24の反応面102上に設置し、その上から蛋白質含有試料を添加することによって、蛋白質含有試料を正確に結晶化区画32に充填することができる。

なお、サンプル充填補助具54は、成形の容易さ、強度、耐塩性などの観点から、ステンレス製であることが好ましい。また、サンプル充填補助具54には、蛋白質含有試料を結晶化区画32に充填した後にサンプル充填補助具54を容易に取り外せるように、ピンセット等により取り扱う部位が設けられていることが好ましい。例えば一端が上側に折り曲げられて折曲部59が設けられていることが好ましい。

ここでは、ガイドピン52をサンプル充填補助具位置決め孔50およびプレート位置決め孔46にそれぞれ固定した。しかしプレート24において、サンプル充填補助具位置決め孔50が、プレート位置決め孔46と独立して複数形成されていてもよい。

蛋白質含有試料を結晶化区画32に充填する方法としては、蛋白質含有試料を全ての結晶化区画32に同一の分量で充填することができ、結晶化区画32以外の構成要素への付着を抑えられる方法であればよい。例えば、サンプル充填補助具54を用いずに、ピペッター等を用いて結晶化区画32の各々に蛋白質含有試料を充填することができる。また、サンプル添加用の自動機器を用いることもできる。

ただし、蛋白質含有試料の充填を迅速かつ経済的に行うためには、上記のサンプル充填補助具54を用いる方法が好ましい。

なお、蛋白質含有試料の充填においてピペッターを用いる場合、ピペッターに吸引して保持させた蛋白質含有試料を吐出する機構を用いずに、ピペッターの先端部に付着した微量の液滴を結晶化区画32付近に接触させることが好ましい。

#### [蛋白質結晶化装置の組み立て]

図1に示すように、支持体20上のマーキング28に合わせて、パッキング22を設置する。そして蛋白質結晶化用マイクロアレイ18を、該パッキング22の中空部23に格納されるように支持体20上に設置する。

蛋白質含有試料が結晶化区画32に充填されたプレート24を、反応面102を下にして保持するそして支持体20に支持された蛋白質結晶化用マイクロアレイ18の上に積層する。

このとき、支持体20上に設けられたプレート位置決め部材44が、プレート24に穿たれたプレート位置決め孔46を貫通するようにする。

なお、この例では支持体20に支持された蛋白質結晶化用マイクロアレイ18の上に、プレート24が反応面102を下にして積層される。しかし、結晶化区画32に蛋白質含有試料が充填されたプレート24を、反応面102を上にして静置し、該プレート24の上に、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18を支持した支持体20を、マイクロアレイ支持面100を下にして積層してもよい。プレート24の外側面104を上にして設置されると、シール剤注入口48からのシール剤の注入、あるいは結晶化区画32に析出した結晶の観察を行いやすいため好ましい。

プレート24を支持体20に押し付けて保持し、保持したまま第一のネジ孔4

0、第二のネジ孔42にネジ41を螺挿して、プレート24と、支持体20に支持された蛋白質結晶化用マイクロアレイ18とを圧接する。

その後、顕微鏡を用いて、蛋白質含有試料の充填状態を確認する。

蛋白質含有試料が各々の結晶化区画32に充填されていることを確認した後、図5、8に示すようにプレート24に穿たれたシール剤注入口48から、ピペット等を用いてシール剤をシール部30および凹部34に充填する。このことにより、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18のうち結晶化剤保持部16以外の位置に漏出した蛋白質含有試料を、シール剤で置き換えることができる。そして、蛋白質含有試料が隣接する結晶化区画32間で移動することによるコンタミネーションおよび条件変化をさらに確実に防止する。更には蛋白質含有試料が蒸発することを防止することができる。なお、シール剤の注入量は、シール部30の全域において凹部34にシール剤が行き渡り、かつ、図5、8に示すような一方のシール剤注入口48からシール剤を注入した際に、他方のシール剤注入口48からシール剤が漏出しない最大量であることが好ましい。

#### [蛋白質の結晶化条件のスクリーニング]

組み立てられた蛋白質結晶化装置を用いて、蛋白質の結晶化条件のスクリーニングを行い、目的蛋白質における最適な結晶化条件を求めることができる。また、析出した結晶を用いて構造解析に適した結晶を作製することもできる。

蛋白質結晶化装置において蛋白質結晶化剤と蛋白質含有試料とを反応させた後、蛋白質結晶化装置を、蛋白質が析出するのに十分な時間にわたって、ある温度条件下にて、密閉状態または大気中に静置する。

蛋白質が析出するのに十分な時間とは、特定の蛋白質、濃度、結晶化条件などにより異なるが、約1時間～10日であり、およそ30日以上経過しても結晶が析出しない場合には、その結晶化条件は適切ではないものとみなす。また、温度条件は、蛋白質結晶化条件の一要因であるため、温度条件を変更して結晶化を行ってもよい。温度条件は、例えば、4°C、15°C、18°C、22°C等のように、複数の段階に設定することが好ましい。

蛋白質が析出するのに十分な時間が経過した後、蛋白質の結晶析出の状況を観察する。このとき、プレート24の外側面104側から、例えば光学顕微鏡等に

て観察することが好ましい。

このようにして、対象の蛋白質について最適な結晶化条件を決定することができる。

#### 〔構造解析用の結晶の作製〕

蛋白質の結晶化を目的として、結晶化区画3 2の容量を0. 5  $\mu$  l以上とした場合は、全ての結晶化区画3 2のうち、結晶の析出した結晶化区画3 2において、引き続いて結晶を成長させる、あるいは析出した結晶を結晶化区画3 2から回収して種結晶として用い、公知の蛋白質結晶化方法により、種結晶を回収した結晶化区画3 2と同様の結晶化条件において、構造解析用の結晶を作製することができる。公知の蛋白質結晶化方法としては、例えば、ハンギングドロップ法、シッティングドロップ法、透析法、バッチ法などが挙げられる。

蛋白質結晶化条件のより迅速なスクリーニングを目的として、結晶化区画3 2の容量を0. 5  $\mu$  l未満とした場合は、求めた最適の結晶化条件において目的蛋白質の結晶化を行い、構造解析用の結晶を得ることができる。このとき、構造解析用の結晶を得る方法としては、公知の方法、例えば蒸気拡散法、ハンギングドロップ法などを用いることができる。

得られた構造解析用の結晶を回収し、回収した結晶を公知の方法でX線構造解析に供することにより、対象の蛋白質の立体構造を決定することができる。

この例の蛋白質結晶化装置においては、蛋白質含有試料を結晶化区画3 2に充填した後に、プレート2 4と蛋白質結晶化用マイクロアレイ1 8が積層されることによって、結晶化剤保持部1 6と蛋白質含有試料を充填した結晶化区画3 2とが対応して重なり合う。このことによって、結晶化剤保持部1 6に保持された結晶化剤が、結晶化区画3 2内へ移動して蛋白質と反応する。各々の結晶化剤保持部1 6が異なる結晶化条件に設定されている場合、対象の蛋白質が結晶化するために適当な結晶化条件に設定された結晶化区画3 2内に結晶が析出する。

以上説明したように、この例の蛋白質結晶化装置において、蛋白質含有試料は結晶化区画3 2内に保持されて結晶化剤保持部1 6により密閉される。また各々の結晶化区画3 2が凹部3 4によって隔離されている。従って、蛋白質含有試料の結晶化区画3 2間での移動及び／又は蛋白質結晶化剤の結晶化剤保持部1 6間

での混合を防止することができる。更には、蛋白質含有試料からの溶液の蒸発を抑制し、n 1 レベルの微少量の蛋白質含有試料をも安定して保持することができる。したがって、高い信頼性をもって蛋白質の結晶化を行うことができる。また、結晶化条件の好不適を信頼性よく判定することができる。

さらに、凹部 3 4 にシール剤が充填されると、さらに効率よく蛋白質含有試料どうしの混合および近接する結晶化区画 3 2 への侵入を防止することができる。また、蛋白質含有試料の蒸発を防止することができる。従って、蛋白質含有試料が微量であっても結晶化条件を良好に制御することができる。

また、蛋白質結晶化用マイクロアレイ 1 8 を支持した支持体 2 0 と、プレート 2 4 とを圧接すると、結晶化区画 3 2 を安定して密閉することができる。そのため、さらに高い信頼性をもって結晶化を行うことができる。

結晶化区画 3 2 の容量を適宜選択することにより、蛋白質結晶化条件のスクリーニングおよび構造解析用の結晶の作製のいずれをも、迅速かつ正確に行うことができる。

さらにサンプル充填補助具を用いると、簡便かつ迅速に、蛋白質の結晶化条件のスクリーニングを行うことができる。

本発明の蛋白質結晶化装置は、例えば、医薬分野等における研究、開発において、蛋白質の結晶化条件のスクリーニングおよび蛋白質の構造解析用結晶の作製のいずれにも、好適に用いることができる。

本発明の蛋白質結晶化用ゲルは、蛋白質結晶化剤、不飽和单量体を含む溶液をゲル化することにより、該蛋白質結晶化剤がゲル中に均一に分散、溶解されたことを特徴とするものである。

蛋白質結晶化剤としては、蛋白質溶液の蛋白質の溶解度を下げるができるものであれば特に限定はない。例えば、塩類として、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リチウムクロライド、マロン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸リチウム、硝酸ナトリウム、硫酸カドミウム、硫酸ナトリウム等が挙げられる。有機溶媒としては 2-メチル-2, 4-ペンタンジオール (以下、MPD とする)、エタノール、イソプロパノール、ジオキサン、メタノール、tert-ブタノール、n-ブロパン

ール等が挙げられる。水溶性高分子化合物としては、ポリエチレングリコール(以下、PEGとする)、ポリエチレングリコールモノアルキルエーテル、ポリエチレンイミン等が挙げられる。

これらの沈殿剤は、単独もしくは2種類以上の組み合わせで使用することができる。これらの中で、特に、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、リン酸カリウムナトリウム、リチウムクロライド、マロン酸ナトリウム、MPD、PEGが好適である。

市販品として、Emerald BioStructures 社製「WIZARD II」、Hampton Research 社製「Crystal screen」、「Grid Screen」等を用いることができる。沈殿剤の使用濃度は、塩類では0.1～5.0mol/Lが好ましく、有機溶媒では1～80体積%が好ましく、水溶性高分子化合物では1～50重量%が好ましい。

蛋白質の結晶化は特定のpH領域で行うことが好ましく、pHを維持するために緩衝液を使用しても良い。使用する緩衝液には特に限定はないが、例えば、クエン酸、2-(N-モリホリノ)エタンスルホン酸、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-エタンスルホン酸、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、N, N-ビス(ヒドロキシエチル)グリシン等を含有するものが挙げられ、単独もしくは2種類以上の混合物を、必要に応じて酸あるいはアルカリなどで中和し所定のpHに調整する。pHは、3.0～10.0の範囲が好ましく、4.0～9.0の範囲がより好ましい。

本発明において、ゲル化剤として不飽和单量体が使用される。不飽和单量体は、水性媒体中で重合することによりゲル形成が可能なものであれば特に限定はないが、(メタ)アクリルアミド系モノマーや(メタ)アクリル系モノマーであることが好ましい。

(メタ)アクリルアミド系モノマーとしては、(メタ)アクリルアミド、N, N-ジメチルアクリルアミド、N, N-ジエチルアクリルアミド等のN, N-ジアルキルアミノ(メタ)アクリルアミド、(メタ)アクリルアミドメタンスルホン酸、(メタ)アクリルアミドエタンスルホン酸、2-(メタ)アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸等の(メタ)アクリルアミドアルキルスルホン酸、ジメチルアミノプロピル(メタ)アクリルアミド、ジエチルアミノプロピル(メタ)

アクリルアミド、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリルアミド等のジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリルアミド、ジメチルアミノプロピル（メタ）アクリルアミドメチルクロライド塩、ジエチルアミノプロピル（メタ）アクリルアミドメチルエチルクロライド塩、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリルアミドメチルクロライド塩等のジアルキルアミノ（メタ）アクリルアミド4級アンモニウム塩が好適に用いられる。

また、（メタ）アクリル系モノマーとしては、2-ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、4-ヒドロキシブチル（メタ）アクリレート、6-ヒドロキシヘキシル（メタ）アクリレート、ジエチレングリコールモノ（メタ）アクリレート、トリエチレングリコールモノ（メタ）アクリレート、ポリエチレングリコールモノ（メタ）アクリレート等の水酸基含有（メタ）アクリレート、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート、ジエチルアミノエチル（メタ）アクリレート等のジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレート、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレートメチルクロライド塩、ジエチルアミノエチル（メタ）アクリレートのエチルクロライド塩等のジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレートの4級アンモニウム塩が好適に用いられる。

モノマー濃度は、蛋白質結晶化剤溶液100質量%に対し、0.1～50質量%が好ましく、1～10質量%がより好ましい。

また、本発明で必要に応じて使用される上記のモノマーと共に重合可能な架橋性モノマーとしては、2官能以上のラジカル重合性基を有する单量体ならば特に限定はないが、例えばN, N' -メチレンビス（メタ）アクリルアミド、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、ジエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、トリエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、ポリエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパントリ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパンエチレンオキサイド変性トリ（メタ）アクリレート等が挙げられるが、特にN, N' -メチレンビス（メタ）アクリルアミド、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、ポリエチレングリコールジ（メタ）アクリレートが好適である。架橋性モノマーの添加量は、（A）群あるいは（B）群のモノマーに対し、0.01～10質量部である。好ましくは0.1～5質量部であ

る。

本発明の蛋白質結晶化剤は、特定の沈殿剤と特定の不飽和単量体とを組み合わせることにより、透明ゲルを得ることができる。ゲルが透明であると、生成した蛋白質結晶の観察が極めて容易となる。そのため、光学的検出系による自動化もより容易となる。

透明ゲルが得られる不飽和単量体及び蛋白質結晶化剤の組み合わせとしては、

- (1) アクリルアミド、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩の群から選択される少なくとも1種のモノマーと塩化ナトリウム、(2) ジメチルアクリルアミドとMPD、(3) 2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸リチウム、(4) メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩と硫酸アンモニウム、(5) アクリルアミドとマロン酸ナトリウム、(6) ポリオキシエチレンモノアクリレートとPEG6k、である。

本発明の蛋白質結晶化剤は、少なくとも沈殿剤、緩衝液、不飽和単量体を含有してなる水溶液を熱重合させて調製する。あるいは熱および/または光ラジカル重合開始剤存在下に重合させることによりゲル化させ、沈殿剤をゲル中に均一に保持させることにより調製することができる。ラジカル重合開始剤存在下に重合を行うのが好適である。水溶液中において好適に使用されるラジカル重合開始剤としては、例えば、tert-ブチルハイドロパーオキサイド、過酸化水素、過硫酸アンモニウム、過硫酸カリウム等の過酸化物、2, 2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)2塩酸塩、2, 2'-アゾビス(2-アミジノブタン)2塩酸塩、2, 2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]2塩酸塩等のアゾ系重合開始剤が挙げられる。これらのラジカル重合開始剤は、単独もしくは2種類以上の混合物として使用することができる。また、前記の過酸化物に第三級アミン、亜硫酸塩、第1鉄塩等の還元剤を組み合わせたレドックス系重合開始剤、さらには、レドックス系重合開始剤とアゾ系重合開始剤を組み合わせた併用重合開始剤を使用してもよい。

また、特定波長の光を与える光源下で、光ラジカル重合開始剤を用いて重合を行うこともできる。その際、使用される光ラジカル重合開始剤は、特定波長の範

囲内の光照射により分解し、ラジカルを発生するものであれば特に限定はない。好適に利用できるものとしては、例えば、アシルホスフィンオキサイド、ベンゾイン、ベンゾインアルキルエーテル、ベンジル、ベンゾフェノン、アントラキノン等の通常光重合に使用される開始剤、その他に、2, 2' -アゾビス(2-メチルプロピオニアミジン) 塩酸塩、4, 4' -アゾビス(4-シアノ吉草酸) ナトリウム塩、2, 2' -アゾビス[2-メチル-N-(2-ヒドロキシエチル)プロピオニアミド] 等のアゾ系重合開始剤が挙げられる。これらのうちから、利用する光波長に応じて、任意のものを1種類以上を選択し使用することができる。また、前記の特定波長とは、反応液中に含有される単量体自身による光吸収、ラジカル生成に利用される光量子エネルギーの二つの点を考慮すると、波長が200～650 nmの領域の光を用いることが望ましい。波長が200～650 nmの領域の光照射に利用可能な光源の代表例としては、高圧水銀ランプ、低圧水銀ランプ、メタルハライドランプ、蛍光ケミカルランプ、蛍光青色ランプ等が挙げられる。

### 実施例

#### (中空纖維配列体の作製)

結晶化剤保持部を支持する構成要素として、中空纖維配列体を作製した。

直径0.32 mmの孔を有し、孔の中心間距離が0.42 mm多孔版であって、縦横各10列に合計100個配列された厚さ0.1 mmの多孔板2枚を重ね、これらの多孔版の各孔に、ポリエチレン製中空纖維(三菱レイヨン社製、外径約500  $\mu$ m、内径約300  $\mu$ m、長さ約100 cm) 100本を通過させた。ついで、中空纖維を張った状態で、中空纖維の一方の端部から10 cmの位置と40 cmの位置の2箇所を固定し、2枚の多孔板の間隔を30 cmとした。

次に2枚の多孔板間の空間の3方を、シリコン製の板状物で囲んだ。開放された一方から、樹脂原料として、ポリウレタン樹脂接着剤からなる樹脂と、樹脂原料の総質量に対し2.5質量%のカーボンブラックとの混合物を、2枚の多孔板の間に流し込んだ。引き続き、室温で1週間静置し、樹脂を硬化させた。その後、多孔板及び多孔板間に設置した板状物を取り除き、中空纖維配列体を得た。

## (中空纖維配列体への高分子ゲルの導入固定化)

以下の組成からなる混合溶液を調製した。

アクリルアミド：3. 7質量部メチレンビスアクリルアミド：0. 3質量部2, 2' -アゾビス(2-アミジノプロパン)二塩酸塩：0. 1質量部

上記の混合溶液と、上記で得られた中空纖維配列体とをデシケータ中に入れ、各中空纖維の自由端部の内、長い方の端部をこの混合液中に浸漬した状態で、デシケータ内を減圧状態にすることにより、中空纖維の中空部に前記混合液を導入した。ついで、この中空纖維配列体を、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、80°Cで4時間かけて重合反応を行った。このことにより、アクリルアミドゲルが中空纖維の中空部に固定された中空纖維配列体を得た。

## (ゲル充填中空纖維配列体薄片の作製)

上記で得られたアクリルアミドゲル含有中空纖維配列体を、中空纖維の長手方向に直交する方向でマイクロトームを用いて約2mmの厚さに切り出すことにより、中空纖維の中空部にゲルが充填された縦横各々10個、計100個の中空纖維が規則的に正方に配列された配列体薄片を得た。図2は、上記工程によって得られたゲル含有中空纖維配列体薄片を示す。図2に示すように、中空纖維12の中空部14には上記で作製したアクリルアミドゲルが充填されている。

## (蛋白質結晶化用マイクロアレイの作製)

上記で作製したゲル含有中空纖維配列体薄片において、中空纖維12の中空部14に充填されたアクリルアミドゲルに、下記のA、B、C、D、E、F、G、H、I、Jの水溶液からなる蛋白質結晶化剤1μlを各中空部に保持されたゲルに添加することにより、アクリルアミドゲルに蛋白質結晶化剤を保持させ、蛋白質結晶化用マイクロアレイ18を作製した。

A：2. 0 mol/L 塩化ナトリウム水溶液B：0. 5 mol/L 塩化ナトリウム水溶液C：10体積% ポリエチレングリコール(分子量400)水溶液D：20体積% ポリエチレングリコール(分子量400)水溶液E：10体積% ポリエチレングリコール(分子量6000)水溶液F：20体積% ポリエチレングリコール(分子量6000)水溶液G：20体積% 2-メチル-2, 4-ペンタンジオール水溶液H：20体積% 2-メチル-2, 4-ペンタンジオ

ル水溶液 I : 0. 5 mol/L 硫酸アンモニウム水溶液 J : 1. 5 mol/L 硫酸アンモニウム水溶液

以下、上記 A～J の蛋白質結晶化剤を保持した結晶化剤保持部 16 を、それぞれスポット A～J と称する。

#### 蛋白質結晶化条件のスクリーニング

図 1 に示す蛋白質結晶化装置を用い、リゾチーム（シグマアルドリッヂ社製）の結晶化条件のスクリーニングを行った。蛋白質結晶化用マイクロアレイとして上記で作製した蛋白質結晶化用マイクロアレイ 18 を用い、支持体 20 、プレート 24 の材料としてアクリル樹脂を用いた。

#### （蛋白質含有試料の添加）

図 6 に示すサンプル充填補助具 54 を用いて、結晶化区画 32 に蛋白質含有試料を充填した。サンプル充填補助具 54 は、上記で得た蛋白質結晶化用マイクロアレイ 18 の結晶化剤保持部 16 に対応した配列の穿孔 56 を有するものを用いた。

結晶化区画 32 は、直径 : 0. 7 mm 、高さ : 0. 15 mm の一端が閉じた円筒状であり、結晶化区画 32 の容量は 105 nL であった。

蛋白質含有試料として、リゾチーム含有水溶液 (80 mg/mL) を使用した。

まず、サンプル充填補助具 54 を、図 6 に示すようにプレート 24 上に設置し、その上に、 $20 \mu\text{l}$  オートピペットで蛋白質含有試料  $1.5 \sim 2 \mu\text{l}$  を穿孔 56 の全ての上に行き渡るように添加した。ついで、サンプル充填補助具 54 の上からスパチュラにて、蛋白質含有試料をプレート 24 上に押し付けることにより、蛋白質含有試料をプレート 24 上の全ての結晶化区画 32 に充填した。

#### （蛋白質結晶化装置の組み立て、蛋白質結晶化条件のスクリーニング）

ついで、結晶化区画 32 に蛋白質含有試料の充填されたプレート 24 を、反応面 102 を下にして保持し、支持体 20 に支持された蛋白質結晶化用マイクロアレイ 18 の上に積層した。結晶化区画 32 に蛋白質含有試料が充填されていることを確認した後、プレート 24 に穿たれた一方のシール剤注入口 48 に、プレート 24 の外側面 104 側から、ピペットを用いて、シール剤としてパラフィンオイル（以下、オイルという）を注入した。オイルの注入量は、シール部 30 の全

域にオイルがいきわたり、他方のシール剤注入口48からオイルがあふれる直前までとした。

その後、蛋白質結晶化装置を20°Cで3時間静置した。引き続き、光学顕微鏡にて結晶化区画32内を観察した結果、蛋白質結晶化剤としてポリエチレングリコール水溶液を保持させたスポットBではリゾチームの結晶は認められず、2.0 mol/L 塩化ナトリウム水溶液を保持させたスポットAでは、X線構造解析に最も適した柱状結晶が認められた。

#### (構造解析用の結晶の作製)

さらに、上記の結果を踏まえて、2.0 mol/L 塩化ナトリウム水溶液を蛋白質結晶化剤として用い、リゾチーム含有試料溶液から、ハンギングドロップ法によってリゾチーム結晶を作製した。このとき、得られたリゾチーム結晶の大きさは0.3×0.3×0.5 mmであった。

以上の結果より、リゾチームの結晶化条件のうち、蛋白質結晶化剤の種類および濃度を検討した結果、2.0 mol/L 塩化ナトリウム水溶液が最適の結晶化条件であることが明らかになり、かつ、明らかになった最適の結晶化条件を用いて、X線構造解析に適した結晶を得ることができた。

すなわち、迅速かつ経済的に、高い信頼性をもって、微量の蛋白質含有試料にて蛋白質結晶化条件のスクリーニングを実施することができた。

本発明の蛋白質結晶化用ゲルにおける緩衝液は、以下のものを使用し、常法に従って調製した。

0.1M-クエン酸緩衝液(pH4.0)、0.1M-クエン酸緩衝液(pH5.0)、0.1M-MES(pH6.0)、0.1M-HEPES(pH7.0)、0.1M-Tris(pH8.0)、0.1M-Bicine(pH9.0)

<実施例1> 沈殿剤である塩化ナトリウム0.48 gを10 mlメスフラスコに秤量し、0.1M-クエン酸緩衝液(pH4.0)で定容して1.2M-NaCl水溶液(これをa液とする)を調製した。また、50%アクリルアミド水溶液(三菱レイヨン製)90 gにN,N'-メチレンビスアクリルアミド(以下、MBAAmと略す)5 g、脱イオン水5 gを加えて溶解し、50%モノマー溶液(これをb液とする)を調製した。更に、水溶性重合開始剤である2,2'-ア

ゾビス [2-(2-イミダゾリン-2-イル) プロパン] 二塩酸塩 (和光純薬工業製、VA-044) の10%水溶液 (これをc液とする) を調製した。2m1のサンプルチューブに、a液を840μl、b液を160μl注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液 (1.0M-NaCl、pH4.0、モノマー濃度8%) を調製し、更にc液を10μl添加してよく混合した後、55℃の温浴で3時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。

前記の手順でハイドロゲルを形成したサンプルチューブに、40mg/m1のリゾチーム水溶液1m1を加え、20℃で24時間インキュベートしたところ、リゾチーム水溶液中にリゾチーム結晶が析出していた。尚、結晶生成は肉眼および実体顕微鏡で確認した。

＜実施例2＞ 実施例1において、a液の濃度2.4Mに変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液 (2.0M-NaCl、pH4.0、モノマー濃度8%) を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表-1に示す。

＜実施例3＞ 実施例1において、a液の濃度3.6Mに変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液 (3.0M-NaCl、pH4.0、モノマー濃度8%) を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表-1に示す。

＜実施例4＞ 実施例1において、a液の濃度4.8Mに変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液 (4.0M-NaCl、pH4.0、モノマー濃度8%) を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表-1に示す。

＜実施例5～8＞ 実施例1～4において、緩衝液を0.1M-クエン酸緩衝液 (pH5.0) に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表-1に示す。

＜実施例9～12＞ 実施例1～4において、緩衝液を0.1M-MES緩衝液 (pH6.0) に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の

生成を確認した。結果を表一1に示す。

＜実施例13～16＞ 実施例1～4において、緩衝液を0.1M-HEPES緩衝液(pH7.0)に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表一1に示す。

＜実施例17～20＞ 実施例1～4において、緩衝液を0.1M-Tris緩衝液(pH8.0)に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表一1に示す。

＜実施例21～24＞ 実施例1～4において、緩衝液を0.1M-Biciné緩衝液(pH9.0)に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表一1に示す。

＜実施例25＞ 沈殿剤であるポリエチレングリコール(和光純薬工業製、PEG6000、重量平均分子量：6000)0.55gを10mlメスフラスコに秤量し、0.1M-クエン酸緩衝液(pH4.0)で定容して5.5%-PEG水溶液(これをd液とする)を調製した。また、ポリエチレングリコールモノアクリレート(日本油脂製ブレンマーAE90)95gに、ポリエチレングリコールジアクリレート(新中村化学製NKESTERA-200)を溶解したモノマー溶液(これをe液とする)を調製した。更に、水溶性重合開始剤である2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩(和光純薬工業製、VA-044)の10%水溶液(これをc液とする)を調製した。2mlのサンプルチューブに、a液を920μl、b液を80μlを注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液(5%-PEG、pH4.0、モノマー濃度8%)を調製し、更にc液を10μl添加してよく混合した後、55℃の温浴で3時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。以下、実施例1と同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表一1に示す。

＜実施例26＞ 実施例25において、d液の濃度を11%に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液(10%-PEG、pH4.0、モノマー濃度8%)

を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表一1に示す。

＜実施例27＞ 実施例25において、d液の濃度を22%に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液（20%—PEG、pH4.0、モノマー濃度8%）を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表一1に示す。

＜実施例28＞ 実施例25において、d液の濃度を33%に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液（30%—PEG、pH4.0、モノマー濃度8%）を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表一1に示す。

＜実施例29～32＞ 実施例25～28において、緩衝液を0.1M—クエン酸緩衝液（pH5.0）に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表一1に示す。

＜実施例33～36＞ 実施例25～28において、緩衝液を0.1M—MES緩衝液（pH6.0）に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表一1に示す。

＜実施例37～40＞ 実施例25～28において、緩衝液を0.1M—HEPES緩衝液（pH7.0）に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表一1に示す。

＜実施例41～44＞ 実施例25～28において、緩衝液を0.1M—Tris緩衝液（pH8.0）に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表一1に示す。

＜実施例45～48＞ 実施例25～28において、緩衝液を0.1M—Biciné緩衝液（pH9.0）に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾ

チーム結晶の生成を確認した。結果を表-1に示す。

	沈殿剤	モノマー	pH	ゲル性状	蛋白質結晶化状態
実施例1	1.0M-NaCl	アクリルアミド	4.0	透明ゲル	結晶
実施例2	2.0M-NaCl	アクリルアミド	4.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例3	3.0M-NaCl	アクリルアミド	4.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例4	4.0M-NaCl	アクリルアミド	4.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例5	1.0M-NaCl	アクリルアミド	5.0	透明ゲル	結晶
実施例6	2.0M-NaCl	アクリルアミド	5.0	透明ゲル	結晶
実施例7	3.0M-NaCl	アクリルアミド	5.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例8	4.0M-NaCl	アクリルアミド	5.0	透明ゲル	沈殿
実施例9	1.0M-NaCl	アクリルアミド	6.0	透明ゲル	結晶
実施例10	2.0M-NaCl	アクリルアミド	6.0	透明ゲル	結晶
実施例11	3.0M-NaCl	アクリルアミド	6.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例12	4.0M-NaCl	アクリルアミド	6.0	透明ゲル	沈殿
実施例13	1.0M-NaCl	アクリルアミド	7.0	透明ゲル	結晶
実施例14	2.0M-NaCl	アクリルアミド	7.0	透明ゲル	結晶
実施例15	3.0M-NaCl	アクリルアミド	7.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例16	4.0M-NaCl	アクリルアミド	7.0	透明ゲル	沈殿
実施例17	1.0M-NaCl	アクリルアミド	8.0	透明ゲル	結晶
実施例18	2.0M-NaCl	アクリルアミド	8.0	透明ゲル	結晶
実施例19	3.0M-NaCl	アクリルアミド	8.0	透明ゲル	結晶
実施例20	4.0M-NaCl	アクリルアミド	8.0	透明ゲル	結晶
実施例21	1.0M-NaCl	アクリルアミド	9.0	透明ゲル	結晶
実施例22	2.0M-NaCl	アクリルアミド	9.0	透明ゲル	結晶
実施例23	3.0M-NaCl	アクリルアミド	9.0	透明ゲル	沈殿
実施例24	4.0M-NaCl	アクリルアミド	9.0	透明ゲル	沈殿
実施例25	5%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	4.0	透明ゲル	生成物なし
実施例26	10%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	4.0	透明ゲル	生成物なし
実施例27	20%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	4.0	透明ゲル	結晶
実施例28	30%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	4.0	透明ゲル	結晶
実施例29	5%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	5.0	透明ゲル	結晶
実施例30	10%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	5.0	透明ゲル	結晶
実施例31	20%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	5.0	透明ゲル	結晶
実施例32	30%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	5.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例33	5%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	6.0	透明ゲル	生成物なし
実施例34	10%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	6.0	透明ゲル	生成物なし
実施例35	20%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	6.0	透明ゲル	生成物なし
実施例36	30%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	6.0	透明ゲル	生成物なし
実施例37	5%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	7.0	透明ゲル	生成物なし
実施例38	10%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	7.0	透明ゲル	生成物なし
実施例39	20%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	7.0	透明ゲル	生成物なし
実施例40	30%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	7.0	透明ゲル	生成物なし
実施例41	5%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	8.0	透明ゲル	生成物なし
実施例42	10%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	8.0	透明ゲル	生成物なし
実施例43	20%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	8.0	透明ゲル	生成物なし
実施例44	30%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	8.0	透明ゲル	生成物なし
実施例45	5%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	9.0	透明ゲル	生成物なし
実施例46	10%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	9.0	透明ゲル	生成物なし
実施例47	20%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	9.0	透明ゲル	生成物なし
実施例48	30%PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	9.0	透明ゲル	生成物なし

<実施例49> 沈殿剤である塩化ナトリウム0.48gを10m1メスフラスコに秤量し、0.1M-クエン酸緩衝液(pH4.0)で定容して1.2M-NaCl水溶液(これをa液とする)を調製した。

また、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸47.5gにN,

N'－メチレンビスアクリルアミド（以下、MBAAm と略す）2.5 g、脱イオン水50 gを加えて溶解し、50%モノマー溶液（これをb液とする）を調製した。更に、水溶性重合開始剤である2,2'－アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩（和光純薬工業製、VA-044）の10%水溶液（これをc液とする）を調製した。2mlのサンプルチューブに、a液を840μl、b液を160μl注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液(1.0M-NaCl、pH4.0、モノマー濃度8%)を調製し、更にc液を10μl添加してよく混合した後、55℃の温浴で3時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。

＜実施例50＞ 沈殿剤である塩化ナトリウム0.48 gを10mlメスフラスコに秤量し、0.1M-クエン酸緩衝液(pH4.0)で定容して1.2M-NaCl水溶液（これをa液とする）を調製した。

また、80%メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩水溶液62.5 gにN,N'－メチレンビスアクリルアミド（以下、MBAAm と略す）2.5 g、脱イオン水35 gを加えて溶解し、50%モノマー溶液（これをb液とする）を調製した。更に、水溶性重合開始剤である2,2'－アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩（和光純薬工業製、VA-044）の10%水溶液（これをc液とする）を調製した。2mlのサンプルチューブに、a液を840μl、b液を160μl注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液(1.0M-NaCl、pH4.0、モノマー濃度8%)を調製し、更にc液を10μl添加してよく混合した後、55℃の温浴で3時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。

＜実施例51＞ 沈殿剤で2-メチル-2,4-ペンタンジオール2 gを10mlメスフラスコに秤量し、0.1M-クエン酸緩衝液(pH4.0)で定容して20%－2-メチル-2,4-ペンタンジオール水溶液（これをa液とする）を調製した。

また、ジメチルアクリルアミド47.5 gにN,N'－メチレンビスアクリルアミド（以下、MBAAm と略す）2.5 g、脱イオン水50 gを加えて溶解し、50%モノマー溶液（これをb液とする）を調製した。更に、水溶性重合開始剤である2,2'－アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩（和光純薬工業製、VA-044）の10%水溶液（これをc液とする）を

調製した。2m1のサンプルチューブに、a液を840μl、b液を160μl注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液(1.0M-NaCl、pH4.0、モノマー濃度8%)を調製し、更にc液を10μl添加してよく混合した後、55℃の温浴で3時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。

＜実施例52＞沈殿剤であるリン酸ナトリウム塩1.176g、リン酸カリウム塩0.035gを10m1メスフラスコに秤量し、0.1M-クエン酸緩衝液(pH4.0)で定容して1.0M-リン酸ナトリウム/カリウム塩水溶液(これをa液とする)を調製した。

また、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸47.5gにN,N'-メチレンビスアクリルアミド(以下、MBAAmと略す)2.5g、脱イオン水50gを加えて溶解し、50%モノマー溶液(これをb液とする)を調製した。更に、水溶性重合開始剤である2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩(和光純薬工業製、VA-044)の10%水溶液(これをc液とする)を調製した。2m1のサンプルチューブに、a液を840μl、b液を160μl注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液(1.0M-NaCl、pH4.0、モノマー濃度8%)を調製し、更にc液を10μl添加してよく混合した後、55℃の温浴で3時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。

＜実施例53＞沈殿剤である硫酸アンモニウム3.17gを10m1メスフラスコに秤量し、0.1M-クエン酸緩衝液(pH4.0)で定容して2.4M-硫酸アンモニウム水溶液(これをa液とする)を調製した。

また、80%メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩水溶液62.5gにN,N'-メチレンビスアクリルアミド(以下、MBAAmと略す)2.5g、脱イオン水35gを加えて溶解し、50%モノマー溶液(これをb液とする)を調製した。更に、水溶性重合開始剤である2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩(和光純薬工業製、VA-044)の10%水溶液(これをc液とする)を調製した。2m1のサンプルチューブに、a液を840μl、b液を160μl注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液(1.0M-NaCl、pH4.0、モノマー濃度8%)を調製し、更にc液を10μl添加してよく混合した後、55℃の温浴で3時間重合し、透明なハイドロゲル

を得た。

＜実施例54＞ 沈殿剤であるマロン酸1.04gを10mlメスフラスコに秤量し、20%一水酸化ナトリウム水溶液4gを加えて中和したのち、0.1M-クエン酸緩衝液(pH4.0)で定容して1.0M-マロン酸ナトリウム水溶液(これをa液とする)を調製した。

また、50%アクリルアミド水溶液(三菱レイヨン製)90gにN,N'-'メチレンビスアクリルアミド(以下、MBAAmと略す)5g、脱イオン水5gを加えて溶解し、50%モノマー溶液(これをb液とする)を調製した。更に、水溶性重合開始剤である2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩(和光純薬工業製、VA-044)の10%水溶液(これをc液とする)を調製した。2mlのサンプルチューブに、a液を840μl、b液を160μl注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液(1.0M-NaCl、pH4.0、モノマー濃度8%)を調製し、更にc液を10μl添加してよく混合した後、55℃の温浴で3時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。

### 産業上の利用性

本発明の蛋白質結晶化装置によれば、蛋白質の結晶化実験あるいは結晶化条件のスクリーニングを、迅速かつ経済的に、高い信頼性をもって実施することができる。また、本発明の蛋白質結晶化用ゲルによれば、蛋白質結晶化において、ゲル化反応が完結し、さらには白濁等を生じないゲル状物を形成することができ、蛋白質結晶化剤を保持した透明なゲル状物を提供することができる。

## 請求の範囲

1. 蛋白質結晶化剤を保持した2以上の結晶化剤保持部を有する蛋白質結晶化用マイクロアレイと、前記蛋白質結晶化用マイクロアレイと積層されるプレートとを有し、前記プレートは、前記結晶化剤保持部に対応し蛋白質含有試料を充填可能な結晶化区画と、該結晶化区画の間に設けられた凹部とを有することを特徴とする蛋白質結晶化装置。
2. 前記結晶化剤保持部は、各々異なる蛋白質結晶化条件に調製されたゲルからなることを特徴とする請求項1に記載の蛋白質結晶化装置。
3. 前記蛋白質結晶化用マイクロアレイは、複数の中空管状体を配列してなるマイクロアレイであることを特徴とする請求項1に記載の蛋白質結晶化装置。
4. 前記蛋白質結晶化用マイクロアレイと前記プレートとを圧接する機構をさらに有することを特徴とする請求項1に記載の蛋白質結晶化装置。
5. 前記凹部にシール剤が充填されることを特徴とする請求項1に記載の蛋白質結晶化装置。
6. 前記結晶化区画は、容量が0.5  $\mu$  l未満であることを特徴とする請求項1に記載の蛋白質結晶化装置。
7. 前記結晶化区画は、容量が0.5  $\mu$  l以上であることを特徴とする請求項1に記載の蛋白質結晶化装置。
8. 前記蛋白質結晶化用マイクロアレイは、10～1000個の結晶化剤保持部を有することを特徴とする請求項1に記載の蛋白質結晶化装置。
9. 前記プレートは、前記結晶化区画に析出した結晶を回収する結晶回収機構をさらに有することを特徴とする請求項1に記載の蛋白質結晶化装置。
10. 前記結晶化区画における蛋白質の結晶化をモニタリングする検出機構をさらに有することを特徴とする請求項1に記載の蛋白質結晶化装置。
11. 請求項1ないし10のいずれかに記載の蛋白質結晶化装置の前記結晶化区画に蛋白質含有試料を充填するためのサンプル充填補助具であって、前記結晶化区画に対応した配列の穿孔と、該穿孔を前記プレート上で前記結晶化区画に対応させる位置合わせ機構とを有することを特徴とするサンプル充填補助具。

助具。

12. 請求項11に記載のサンプル充填補助具との位置を合わせる位置決め部が前記プレートに形成されていることを特徴とする請求項1ないし10のいずれかに記載の蛋白質結晶化装置。

13. 請求項12に記載の蛋白質結晶化装置と、請求項11に記載のサンプル充填補助具とを用いる蛋白質結晶化条件スクリーニング法であって、

請求項11に記載のサンプル充填補助具を、該サンプル充填補助具の前記穿孔が前記結晶化区画に対応するように前記プレート上に設置し、蛋白質含有試料を該サンプル充填補助具の上から前記穿孔に添加して前記結晶化区画に充填した後、前記サンプル充填補助具を取り外し、前記結晶化区画と、前記結晶化剤保持部とを対応させて接触させるように、前記プレートと前記蛋白質結晶化用マイクロアレイとを積層することを特徴とする蛋白質結晶化条件スクリーニング法。

14. アクリルアミド、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩の群から選択される少なくとも1種のモノマーを含むゲル状物に塩化ナトリウムが保持されている蛋白質結晶化用ゲル。

15. ジメチルアクリルアミドを含むゲル状物に2-メチル-2,4-ペンタンジオールが保持されている蛋白質結晶化用ゲル。

16. 2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸を含むゲル状物にリン酸ナトリウム/カリウム塩が保持されている蛋白質結晶化剤。

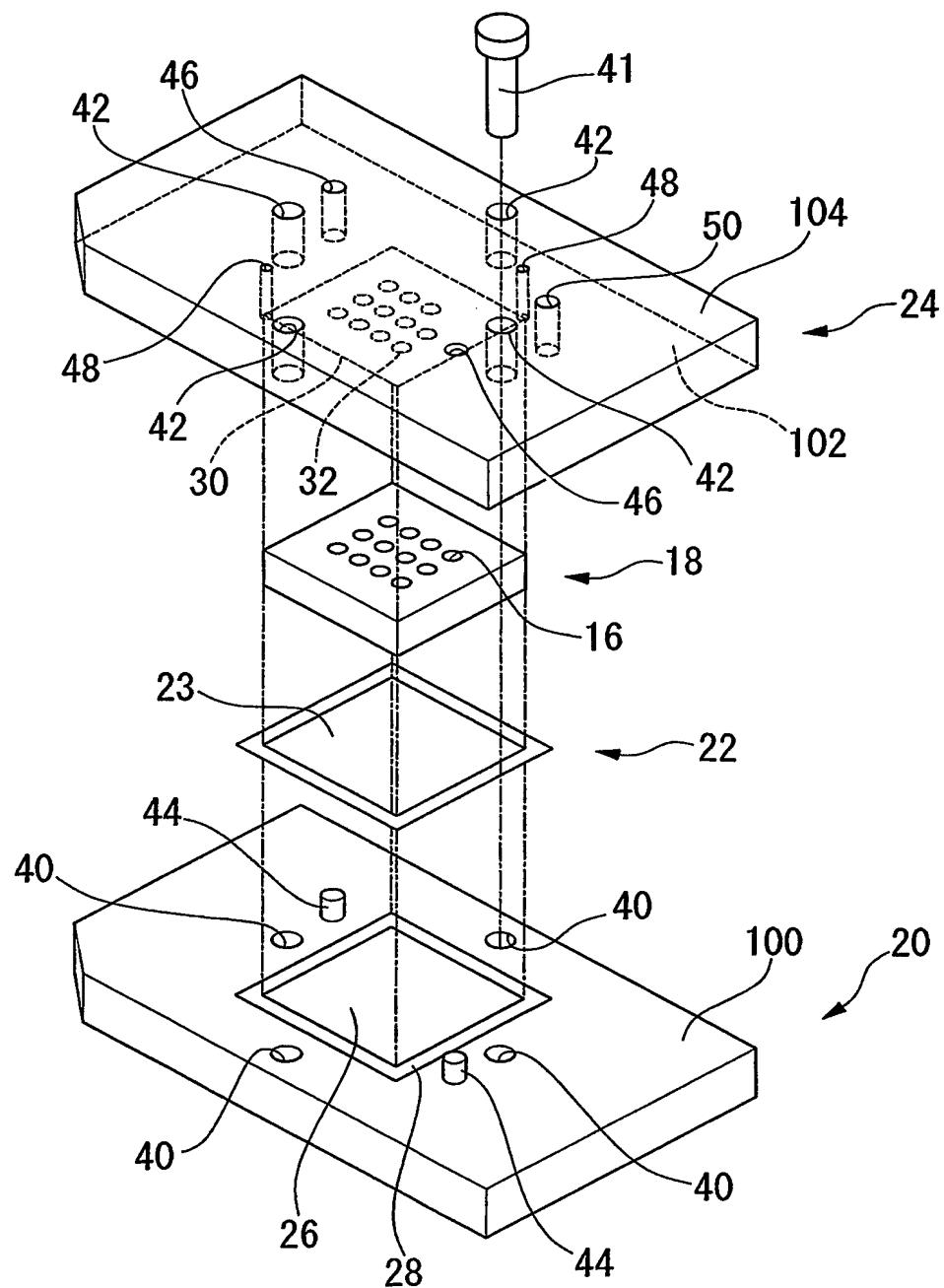
17. メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩を含むゲル状物に、硫酸アンモニウムが保持されている蛋白質結晶化用ゲル。

18. アクリルアミドを含むゲル状物に、マロン酸ナトリウムが保持されている蛋白質結晶化用ゲル。

19. ポリオキシエチレンモノアクリレートを含むゲル状物にポリエチレングリコール 6000 が保持されている蛋白質結晶化用ゲル。

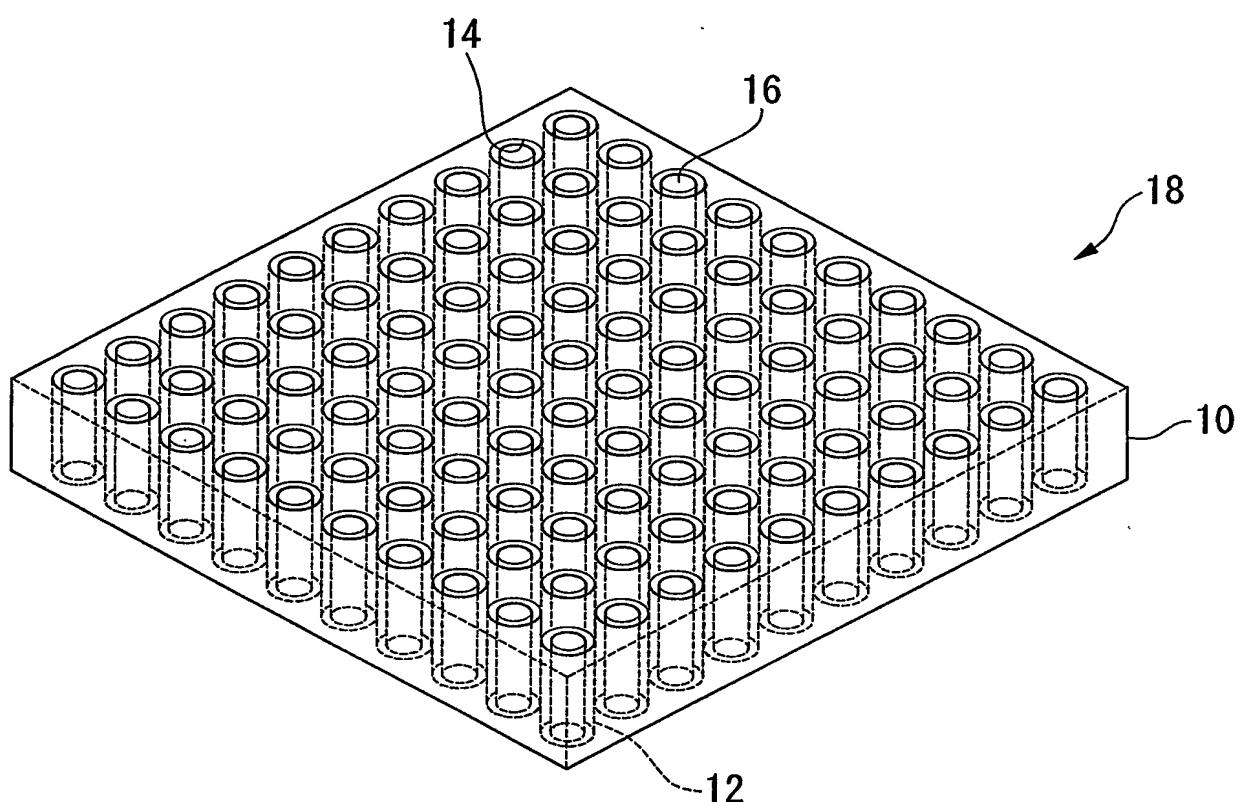
1/5

FIG. 1



2/5

FIG. 2



3/5

FIG. 3

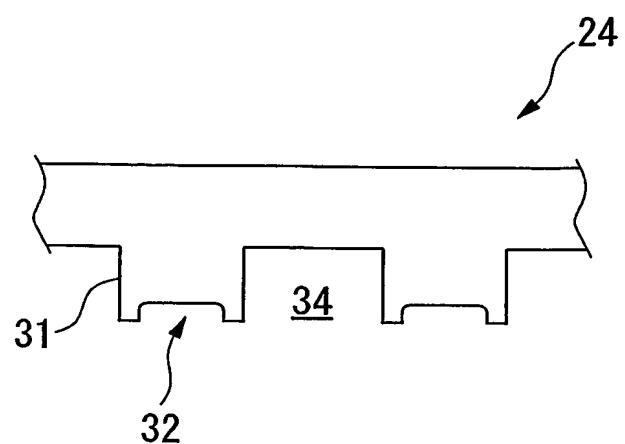
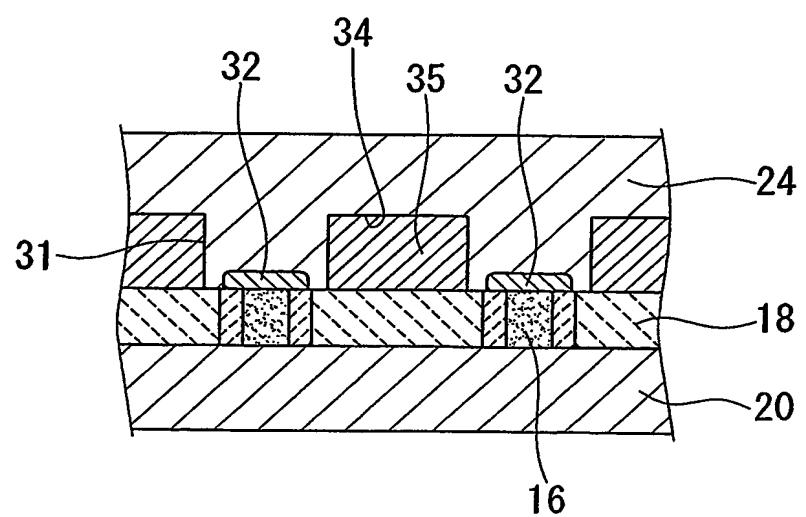


FIG. 4



4/5

FIG. 5

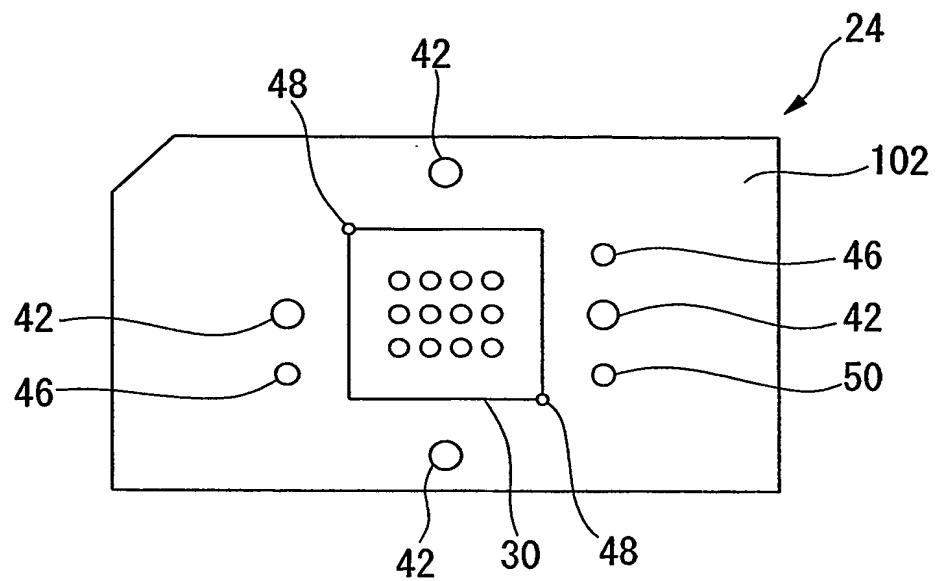
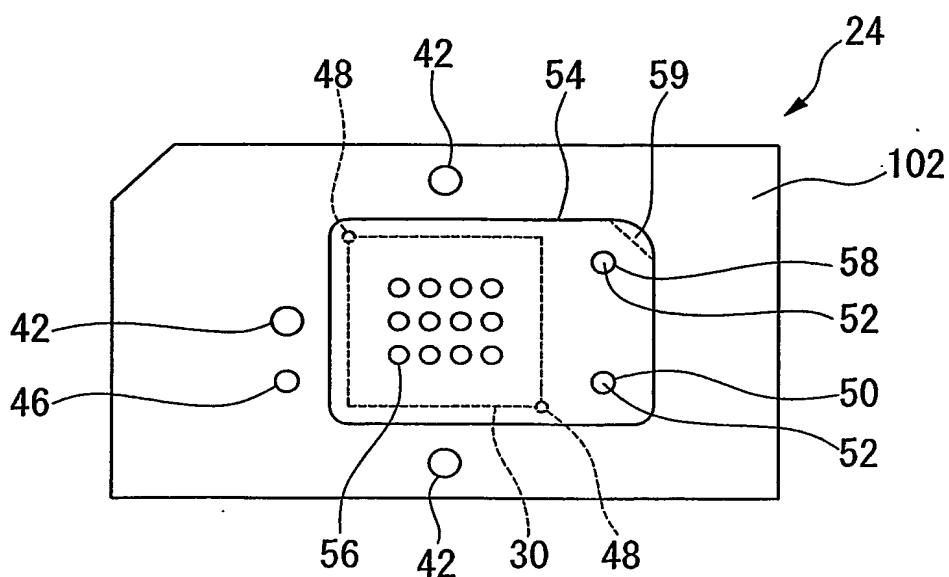


FIG. 6



5/5

FIG. 7

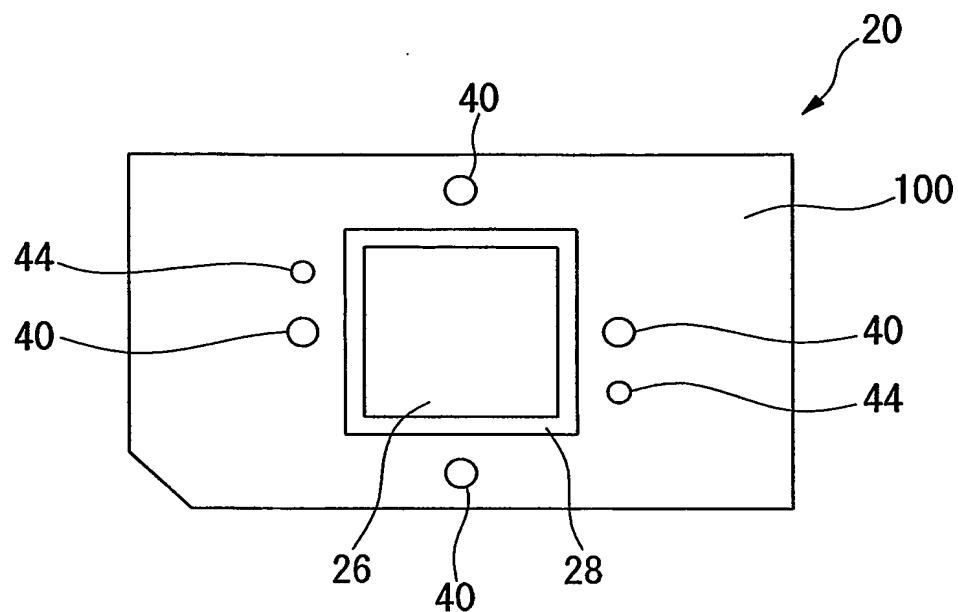
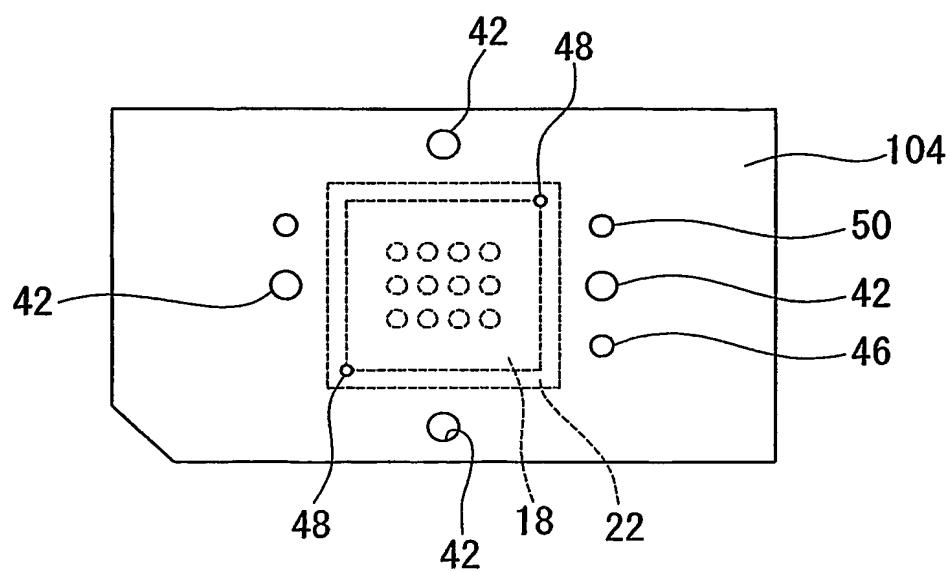


FIG. 8



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011725

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C30B29/58, C07K1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C30B29/58, C07K1/30Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 03/053998 A1 (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 03 July, 2003 (03.07.03), Page 15, line 29 to page 16, line 9; page 17, lines 18 to 28 (Family: none)	14,15 1-13,16-19
A	JP 7-500806 A (Schering Corp.), 26 January, 1995 (26.01.95), & WO 93/07311 A1 & US 5221410 A & EP 553539 A1	1-13
A	JP 2001-136972 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 22 May, 2001 (22.05.01), & WO 00/53736 A1 & EP 1158047 A1	14-19

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 October, 2004 (18.10.04)Date of mailing of the international search report  
02 November, 2004 (02.11.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. C17 C30B29/58, C07K1/30

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. C17 C30B29/58, C07K1/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-2004年  
日本国登録実用新案公報 1994-2004年  
日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
WPI

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 03/053998 A1 (三菱レイヨン株式会社) 2003.07.03 第15頁第29行-第16頁第9頁, 第17頁第18-28行 (ファミリーなし)	14, 15 1-13, 16-19
A	JP 7-500806 A (シェリング・コーポレーション) 1995.01.26 & WO 93/07311 A1 & US 5221410 A & EP 553539 A1	1-13
A	JP 2001-136972 A (三菱レイヨン株式会社) 2001.05.22 & WO 00/ 53736 A1 & EP 1158047 A1	14-19

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリーエ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.10.2004

国際調査報告の発送日

02.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

横山 敏志

4G 2927

電話番号 03-3581-1101 内線 3416